



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 59052

(13) A

(51) 7 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПЕРОКСИДНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ЕРИТРОЦИТАРНИХ МЕМБРАН

1

2

(21) 2002129942

(22) 10 12 2002

(24) 15 08 2003

(46) 15 08 2003, Бюл. № 8, 2003 р.

(72) Гжегоцький Мечислав Романович, Ковальчук
Світлана Миколаївна, Паніна Любов Володимирів-
на, Терлецькі Оксана Іванівна, Пороховська Зоря-
на Степанівна, Мисаковець Олексій Григорович(73) ЛЬВІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО, Гже-
гоцький Мечислав Романович, Ковальчук Світлана
Миколаївна, Паніна Любов Володимирівна, Тер-лецькі Оксана Іванівна, Пороховська Зоряна Сте-
панівна, Мисаковець Олексій Григорович(57) Спосіб визначення пероксидної резистентнос-
ті еритроцитарних мембран, що включає додаван-
ня реагентів до суспензії еритроцитів, інкубацію
проб, центрифугування, спектрофотометрування
супернатантів з подальшим визначенням відсотку
гемолізованих еритроцитів, який відрізняється
тим, що до суспензії еритроцитів в кожну пробу
додають реагент для інгібування каталазної акти-
вності

Винахід відноситься до медицини і може бути
використаний в науково-дослідних лабораторіях
для проведення експериментальних робіт і в кліні-
чних лабораторіях для діагностики ранніх морфо-
функціональних та фізико-хімічних змін еритроци-
тарних мембран.

Зменшення резистентності еритроцитарних
мембран під дією подразнюючих впливів екзо-
/або ендогенної природи є наслідком пошкоджен-
ня метаболічних шляхів збереження і оновлення
ліпідного компоненту, ліпід-білкових взаємодій та
регулювання цих шляхів, що призводить до неста-
більності мембран та гемолізу еритроцитів.

Міра не насиченості жирно кислотних залишків
в молекулах фосфоліпідів та вміст холестерину, в
основному, визначають плинність біологічних
мембран. З іншого боку, ненасичені жирно кислот-
ні структури є основним субстратом перекисного
окислення ліпідів (ПОЛ) біомембран, тому резис-
тентність еритроцитів визначається також забез-
печеністю їх складовими антиоксидантного захис-
ту, як ферментативного, а саме,
супероксиддисмутазою, каталазою, системою глут-
амінового комплексу, та не ферментативного
втамін Е, тощо. Поряд з цим, для повноцінної ути-
лізації активних форм кисню необхідний збалан-
сований обмін речовин, який в еритроцитах обме-
жений анаеробним гліколізмом та
гексозомонофосфатним шляхом.

Тому, визначення резистентності еритроцита-
рних мембран до дії перексиду водню є відобра-
женням комплексу метаболічних змін еритроцитів
та має виключно діагностичну цінність.

Відомий спосіб визначення резистентності
еритроцитів під впливом розчину перексиду вод-
ню //Покровский А.А., Абрамов А.А. К вопросу о
перекисной резистентности эритроцитов // Вопр
питания - 1964 - Т.23, №6 - С.44-49 / проби
центрифугируют. Під пероксидною резистентністю
еритроцитів потрібно розуміти їх гемолітичну стій-
кість під впливом певних концентрацій перексиду
водню у фізіологічному розчині. Цей показник зна-
ходиться у зворотній залежності по відношенню до
ступеня гемолізу, що визначається за стандартних
умов досліду. Суть способу зводиться до визна-
чення процента еритроцитів, що гемолізуються за
стандартних умов під впливом H_2O_2 . Кров вводять
у мікро центрифугальну пробірку, що містить цит-
рат фізіологічного розчину, та центрифугують.
Центрифугат зливають, а осад заливають буфер-
но-фізіологічним розчином, що готують змішуван-
ням рівних об'ємів фізіологічного розчину хлориду
натрію та фосфатного буфера. Після інкубації
еритроцитну завись знову центрифугують і до
осаду еритроцитів додають фізіологічний розчин,
при цьому утворюється суспензія еритроцитів. Для
визначення пероксидної резистентності в 4 пробір-
ки вносять приготовлені суспензії. В перші 3 проби
додають розчини перексиду водню у фосфатному
буфері, а в четверту пробірку - того ж буферного
розчину. Всі проби інкубують в термостаті, а потім
витримують при кімнатній температурі протягом 2
годин. Після цього в усі пробірки, крім третьої, на-
ливають буферно-фізіологічний розчин, а в третю
для одержання повного гемолізу додають дисти-
льованої води. Всі проби центрифугують. Ступінь

(13) A

(11) 59052

(19) UA

гемолізу визначають спектрофотометруванням супернатантів з подальшим визначенням відсотку гемолізованих еритроцитів

Про пероксидну резистентність еритроцитів судять по ступені гемоліза, яка викликана під впливом розчину пероксида водню

Недоліком відомого способу є те, що не забезпечується можливість оцінити реальну кількість гемолізованих еритроцитів, враховуючи відсоток від величини повного гемолізу і тому не досягається точність способу. Окрім того тривалості визначення перекисної резистентності еритроцитарних мембран дуже велика до 3-х годин

В основу винаходу поставлене завдання удосконалення способу визначення пероксидної резистентності еритроцитарних мембран, в якому додавання реагенту для інгібування каталазної активності забезпечує можливість оцінити реальну кількість гемолізованих еритроцитів, враховуючи відсоток від величини повного гемолізу і завдяки цьому досягається підвищення точності способу та зменшення тривалості визначення перекисної резистентності еритроцитарних мембран

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі визначення пероксидної резистентності еритроцитарних мембран, що включає додавання реагентів до суспензії еритроцитів, інкубацію проб, центрифугування, спектрофотометрування супернатантів з подальшим визначенням відсотку гемолізованих еритроцитів, згідно винаходу до суспензії еритроцитів в кожну пробу додають реагент для інгібування каталазної активності

Суть методу полягає у визначенні відсотку гемолізованих еритроцитів під дією пероксиду водню. Для цього кров у кількості 0,25мл з розчином цитрату натрію (2 краплі 0,2М розчину) змішували з 6мл ізотонічного фосфатного буферу (pH-7,4). Центрифугували 10 хвилин при 1500об/хв. Осад еритроцитів резуспензували в 2мл ізотонічного фосфатного буферу. Для визначення перекисної резистентності в 4 пробірки вносили по 0,25мл суспензії еритроцитів і у кожну додавали по 0,08мл 4мМ буферного розчину азиду натрію (для пригнічення каталазної активності) та інкубували 30 хвилин при 37°C. Надалі, у перші три пробірки додавали по 0,17мл 30мМ буферного розчину пероксиду водню, а у четверту ту ж кількість ізотонічного фосфатного буферу. Всі пробірки інкубували одну годину при 37°C. Надалі, у 1-шу, 2-гу і 4-ту пробірки додавали по 4,5мл ізотонічного фосфатного буферу, а у 3-тю, для отримання повного гемолізу, - 4,5мл бідистильованої води. Всі пробірки центрифугували 10 хвилин при 1500об/хв. Супернатант відбирали для визначення міри гемолізу еритроцитів колориметричним способом (при довжині хвилі 540нм)

Відсоток перекисного гемолізу визначали згідно формули, враховуючи відсоток від величини повного гемолізу, середнє арифметичне двох паралельних проб та похибку при введенні азиду натрію

$$A = \frac{\left| \frac{E_1 + E_2}{2} - E_4 \right|}{E_3 - E_4} * 100,$$

де А - міра гемолізу під дією H₂O₂ (у %),

E_{1,2} - оптична щільність двох паралельних дослідних проб,

E₃ - оптична щільність дослідної проби, при повному гемолізі,

E₄ - оптична щільність контрольної проби, при введенні азиду натрію

Спосіб визначення резистентності еритроцитарних мембран до дії пероксиду водню спрощує проведення аналізу, скорочує час визначення у 2 рази внаслідок застосування азиду натрію (порівняно з методом за Покровським А.А., 1964). Представлений спосіб розрахунку дає можливість оцінити реальну кількість гемолізованих еритроцитів, враховуючи відсоток від величини повного гемолізу. Запропонований метод визначення відсотку гемолізованих клітин за вмістом гемоглобіну в надосадному шарі (Денисович В.І., 1973) може бути неточним, оскільки дія пероксиду водню поширюється не тільки на еритроцитарні мембрани, але й може призводити до руйнування структури гемоглобіну з утворенням продуктів його окислення та розпаду (Giulivi C, Davies K., 1990, 2001)

Приклад

При дослідженні крові потенційно здорових людей отримано, в середньому, такі величини оптичної щільності

E₁-0,05, E₂-0,045, E₃-0,330, E₄-0,01, A=14%, отримані дані розраховували згідно формули

$$A = \frac{\left| \frac{0,05 + 0,045}{2} - 0,01 \right|}{0,330 - 0,01} * 100$$

При дослідженні крові щурів контрольної групи, величина перекисного гемолізу становила в середньому 9,5%. Чутливість методу ілюструє той факт, що при введенні тваринам токсичних доз нитриту натрію, величина перекисного гемолізу зросла в середньому до 15,5%

Застосування запропонованого способу забезпечує підвищення точності способу та скорочує тривалість визначення у 2 рази з 3-х годин до 1 год 30хв. Досягається можливість оцінити реальну кількість гемолізованих еритроцитів, враховуючи відсоток від величини повного гемолізу, середнє арифметичне двох паралельних проб та похибку при введенні азиду натрію